

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA  
LA MOLINA**

**ESCUELA DE POSGRADO  
MAESTRÍA EN PRODUCCIÓN ANIMAL**



**“MADURACIÓN *in vitro* DE OVOCITOS EN METAFASE II DE  
VACAS POST MORTEM A TRÁVES DE LA TÉCNICA DE  
FIJACIÓN”**

**Presentada por:**

**RONNIE CHRISTIAN DELGADO FERNÁNDEZ**

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE  
MAGISTER SCIENTIAE EN PRODUCCIÓN ANIMAL**

**Lima - Perú**

**2017**

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA  
LA MOLINA**

**ESCUELA DE POSGRADO  
MAESTRÍA EN PRODUCCIÓN ANIMAL**

**“MADURACIÓN *in vitro* DE OVOCITOS EN METAFASE II DE  
VACAS POST MORTEM A TRÁVES DE LA TÉCNICA DE  
FIJACIÓN”**

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE  
MAGISTER SCIENTIAE**

**Presentada por:**

**RONNIE CHRISTIAN DELGADO FERNÁNDEZ**

**Sustentada y aprobada ante el siguiente jurado:**

Dr. Jorge Aliaga Gutiérrez  
**PRESIDENTE**

Mg.Sc. Enrique Alvarado Malca  
**PATROCINADOR**

Mg.Sc. Próspero Cabrera Villanueva  
**MIEMBRO**

Mg.Sc. Jorge Vargas Morán  
**MIEMBRO**

## **DEDICATORIA**

A mis padres Jaime y Rocío, ya que sin ellos no podría ser haber alcanzado todos los logros que he deseado.

A mi hija Aleshka Valentina, ya que es el motor de mi vida y por quien busco ser una mejor persona en mi vida.

A mi hijo Christian Ariel, una nueva bendición que Dios me regaló.

## **AGRADECIMIENTOS**

Le agradezco en especial al Mg. Sc. Enrique Alvarado Malca, mi patrocinador quien me tuvo paciencia, guio y apoyo académicamente en la elaboración de este trabajo de investigación.

A los miembros de mí jurado evaluador: Dr. Jorge Aliaga Gutiérrez, Mg. Sc. Prospero Cabrera Villanueva, Mg. Sc. Jorge Vargas Morán por su apoyo en la elaboración de la presente tesis.

Al excelente personal del centro de Investigación y Transferencia de Embriones (CIETE), en especial a la Dra. Amalia Gallegos, MVZ. Silvia León Trinidad. Quienes me apoyaron y dieron la oportunidad de realizar la práctica en el laboratorio del CIETE.

## ÍNDICE GENERAL

	Pág.
I. INTRODUCCION .....	01
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	02
2.1. Ovogénesis y Foliculogénesis.....	02
2.1.1. Cronología .....	02
2.1.2. Ovogénesis .....	02
2.1.3. Foliculogénesis.....	04
2.1.4. Maduración del ovocito .....	05
2.2. Obtención de ovocitos.....	06
2.2.1. Ovocitos post-ovulatorios .....	06
2.2.2. Ovocitos pre-ovulatorios.....	07
2.3. Factores que influyen en la maduración <i>in vitro</i> .....	08
2.3.1. Obtención de ovarios y ovocitos.....	08
2.3.2. Selección y clasificación de los ovocitos .....	09
2.4. Métodos de maduración <i>in vitro</i> .....	10
2.4.1. Medios de maduración.....	10
2.4.2. Modificación de los medios de cultivo.....	10
2.4.3. Condiciones del cultivo <i>in vitro</i> .....	11
2.4.4. Sistemas de maduración <i>in vitro</i> .....	12
2.4.5. Sustancias foliculares en la maduración <i>in vitro</i> .....	13
2.4.6. Reguladores de la maduración <i>in vitro</i> .....	14
2.5. Descripción del ovocito, criterios de maduración.....	16
2.5.1. Morfología del ovocito inmaduro.....	16
2.5.2. Morfología del ovocito durante la maduración.....	16
2.5.3. Morfología del ovocito maduro.....	17
III. MATERIALES Y METODOS .....	18
3.1. Localización y Animales .....	18
3.2. De los Animales.....	18
3.3. Materiales y Equipo .....	18

3.3.1. Recolección de ovarios .....	18
3.3.2. Preparación de medios.....	20
3.4. Métodos.....	21
3.4.1. Recolección de ovarios en animales beneficiados .....	22
3.4.2. Método de aspiración .....	22
3.4.3. Clasificación de ovocitos.....	22
3.4.4. Condiciones del medio de maduración .....	23
3.4.5. Fijación y tinción de ovocitos.....	24
3.4.6. Criterios de maduración <i>in vitro</i> .....	25
3.5. Análisis Estadístico .....	26
IV. RESULTADOS Y DISCUSION .....	27
4.1. Cantidad de folículos y recuperación de ovocitos por ovario.....	27
4.1.1. Cantidad de folículos aspirados por ovario.....	27
4.1.2. Cantidad de ovocitos recuperados por ovario.....	28
4.1.2. Cantidad de ovocitos recuperados por categoría.....	29
4.2. Maduración de ovocitos .....	31
V. CONCLUSIONES .....	35
VI. RECOMENDACIONES .....	36
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	37

## ÍNDICE DE TABLAS

	Pag.
<b>TABLA 1:</b> Descripción morfológica de los estadios meióticos durante la maduración de los ovocitos bovinos.....	07
<b>TABLA 2:</b> Clasificación de ovocitos por el número de células de cúmulos y citoplasma.....	10
<b>TABLA 3:</b> Clasificación morfológica de los ovocitos .....	23
<b>TABLA 4:</b> Recuperación de ovocitos.....	27
<b>TABLA 5:</b> Estadios de maduración <i>in vitro</i> de los ovocitos tipo a y b .....	33
<b>TABLA 6:</b> Porcentaje de estadios de maduración <i>in vitro</i> de los ovocitos tipo a y b .....	34

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Pag.
<b>FIGURA 1:</b> Etapas de ovogénesis.....	4
<b>FIGURA 2:</b> Expansión del cúmulo.....	25
<b>FIGURA 3:</b> Cantidad promedio de folículos por ovario.....	28
<b>FIGURA 4:</b> Cantidad de ovocitos recuperados por ovario.....	29
<b>FIGURA 5:</b> Cantidad de ovocitos por categoría por grupo.....	30
<b>FIGURA 6:</b> Promedio de ovocitos por categoría por grupo.....	30
<b>FIGURA 7:</b> Tasa de maduración y estados meióticos.....	34



## ÍNDICE DE ANEXOS

	Pag.
<b>ANEXO 1:</b> Prueba de $\chi^2$ para estadios de maduración <i>in vitro</i> de los ovocitos tipo a Y b.....	43

## RESUMEN

El presente trabajo consistió en la evaluación de la maduración *in vitro* a través de la técnica de fijación de ovocitos en metafase II obtenidos de vacas criollas post mortem. Ovocitos recuperados a través de la técnica de aspiración folicular de ovarios recolectados en el camal de Yerbateros, se determinó el número de ovocitos por categorías y fueron madurados en medio de TCM 199 durante 24 horas a 38°C en una atmosfera de 5 por ciento de CO<sub>2</sub> y 90 por ciento de humedad. Al finalizar el periodo de maduración, los ovocitos fueron fijados en etanol: Ácido acético (3/1) durante 48 horas y en refrigeración 4°C. Para luego ser teñidos con aceto-orceína para evaluar el estadio nuclear bajo microscopio de lente invertido, el porcentaje de ovocitos que alcanzaron el estadio de metafase II fue de 57.78 por ciento, mientras los no determinados eran un 17.52 por ciento y en profase y metafase I, dieron 7.62 y 17.08 respectivamente. La prueba para la evaluación estadística que se utilizó fue  $\chi^2$  en donde se evaluaron 19 placas. De los ovocitos no determinado (ND) donde la placa 11 es significativa, con un ovocito no determinado (ND) de 6 observadas ( $p=0.07$ ). De los ovocitos en metafase I (MI) la placa 17 es significativa, con 2 ovocitos en metafase I (MI) de 14 observados ( $p=0.001$ ). De los ovocitos en metafase II (MII) de acuerdo a la prueba de  $\chi^2$ , las placas 5 y 7 son significativas estadísticamente, con un numero de ovocitos de 15 de 25 en la placa 5, 12 de 20 en la placa 7 ( $p=0.001$ ).

**Palabras clave:** Maduración *in vitro*, ovocitos, Metafase II, aspiración folicular.

## ABSTRACT

The present work consisted in the evaluation of the maturation of oocytes *in vitro* through the technique of fixation during metaphase II from post-mortem creole cows. Oocytes were recovered through the follicular aspiration technique of ovaries collected in slaughterhouse, and classified by categories and then matured in TCM 199 medium for 24 hours at 38°C in an atmosphere of 5 percent CO<sub>2</sub> and 90 percent humidity. At the end of the maturation period, the oocytes were fixed in ethanol: acetic acid (3/1) for 48 hours and in cooling 4 ° C. Then these were stained with aceto-orcein to evaluate the nuclear stage under inverted lens microscope. The percentage of oocytes that reached the stage of metaphase II was 57.78 percent, while those not determined were 17.52 percent and in prophase and metaphase I, were 7.62 and 17.08 respectively. The test for the statistical evaluation was chi square, with 19 plates evaluated. Of the undetermined oocytes (ND), plate 11 was significant, with an undetermined oocyte (ND) of 6 observed (p = 0.07). Of the oocytes in metaphase I (MI), plate 17 was significant, with 2 oocytes in metaphase I (MI) of 14 observed (p = 0.001). Of the oocytes in metaphase II (MII) according to the chi square test, plate 5 and 7 were statistically significant, with a number of oocytes of 15 of 25 in plate 5, 12 of 20 in plate 7 (p = 0.001).

**Keywords:** In vitro maturation, oocytes, Metaphase II, follicular aspiration.

# I. INTRODUCCIÓN

El nacimiento del primer ternero producto de la fecundación *in vitro* (FIV) fue anunciado por Brackett y col. (1982). En este estudio se utilizó semen fresco para fertilizar un ovocito y el obtener un embrión (estadío de 2 a 4 células) fue transferido al oviducto de la hembra receptora. Extensa literatura científica ha sido publicada hasta la actualidad con el objeto de mejorar la técnica de producción *in vitro* (PIV) de embriones y la viabilidad *In vivo* de los mismos. Desde 1992, esta tecnología fue aplicada en forma exitosa a programas comerciales de mejoramiento genético (Hasler, 1993). En el Perú la técnica de fecundación *in vitro* está en la fase de desarrollo, siendo el Centro de Investigación y Enseñanza en Transferencia de Embriones (CIETE) una de las instituciones que la viene desarrollando desde el año 2003. Son muchas las ventajas de esta tecnología como:

Reducción del costo de embrión debido a la mayor cantidad de embriones producidos, por vaca/año. Utilizando hembras que no responden a tratamientos superovulatorios, recuperar ovocitos de hembras de alta genética que van a camal por algún accidente, o en vacas preñadas hasta los 5 meses de gestación. Existirá por lo tanto un mayor progreso genético, ya que se reduce el intervalo generacional.

Es por lo tanto de mucha importancia evaluar protocolos, para viabilizar esta técnica y realizar su aplicación en forma comercial.

El objetivo del presente trabajo fue determinar la tasa de recuperación de ovocitos y el número de ovocitos maduros luego del proceso de maduración *in vitro* a través de la técnica de fijación en la etapa de metafase II de vacas post mortem.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1 OOGÉNESIS Y FOLICULOGÉNESIS

#### 2.1.1 Cronología

De Graff (1670), señaló acertadamente que los ovocitos provenían del ovario, aunque se equivocó en señalar que todo el folículo era el gameto femenino. En el año 1825, Von Baer describe la relación anatómica entre el folículo y el ovocito en mamíferos y Waldeyer (1870), fue el primer investigador en plantear que las hembras de los mamíferos poseían una cantidad finita de ovocitos, que es única para toda su vida reproductiva. Zuckermann *et al.* (1962), demostraron, en la década de los años 50, la exactitud de esta teoría.

En cambio Pincus y Enzmann (1935) fueron los primeros en comparar los comportamientos *in vivo* e *in vitro*. En la década de los años 60 y 70, están caracterizadas por la gran cantidad de trabajos que estudian el metabolismo y los requerimientos bioquímicos del cultivo *in vitro* de diversas especies animales (Edwards, 1965).

#### 2.1.2 Ovogénesis

Desde la etapa de la formación embrionaria se forman los gametos femeninos. De células indiferenciadas se generan las células germinales primordiales (Byskov, 1982). Las células germinales primordiales migran a la cresta genital, para así formar el futuro ovario (Gondos, 1978). Estas células se multiplican por mitosis y una parte de estas se diferenciarán y formarán las ovogonias, a partir de las que se formará el ovocito.

La gametogénesis comienza en la vida intrauterina (Baker, 1982), en la cual es necesario una reducción cromosómica (ya que la ovogonia tiene una dotación cromosómica  $2n$  y el ovocito tiene  $n$ ) y un proceso de crecimiento del ovocito, lo mismo al incorporar sustancias nutritivas necesarias para mantener los estadios iniciales del desarrollo embrionario. El proceso de reducción cromosómica se denomina meiosis para que el ovocito pueda ser fecundado.

Las ovogonias se multiplican por meiosis, convirtiéndose en ovocitos primarios, inducida por una sustancia proveniente de las células embrionarias (Baker y Franchi, 1967). Este tipo de multiplicación celular se detendrá en dos momentos específicos: alrededor del nacimiento y en la ovulación y solo se completará totalmente al producirse la fecundación del ovocito. El proceso meiótico consta de dos divisiones llamadas meiosis I y II, divididas cada una a su vez en cuatro fases: Profase, Metafase, Anafase y Telofase, indicado con los términos I y II a su correspondencia a una u otra división.

La meiosis I se completa con la profase I y comienza antes del nacimiento (Zuckermann, 1962). La ovogonia entra en esta fase que a su vez se subdivide en otras, caracterizada por amplios cambios de material cromosómico. El hecho más importante de la profase I, es que al llegar al estadio de dictioteno, el ovocito detiene tanto la meiosis como su crecimiento, hecho que coincide con el momento del nacimiento (Baker y Franchi, 1967). El estadio de dictioteno se caracteriza por la presencia de un núcleo prominente que recibe el nombre de vesícula germinal (Franchi *et al.*, 1962). Figura 1.

El ovario de la hembra recién nacida, contiene muchos ovocitos, detenidos nuclearmente en la primera división de la meiosis (ovocitos primarios) y rodeado por el estroma epitelial ovárico formando folículos primordiales. El número de gametos que poseen las hembras domésticas está fijado desde el mismo momento de su nacimiento, y durante toda la vida del animal se irán liberando. Según Kappeli (1962) hay 150 mil en el vacuno al nacimiento, a los 3 meses en terneras es de 75,000 y a los 10 años 2,500 folículos primordiales (Fernán-Zegarra, 2004).

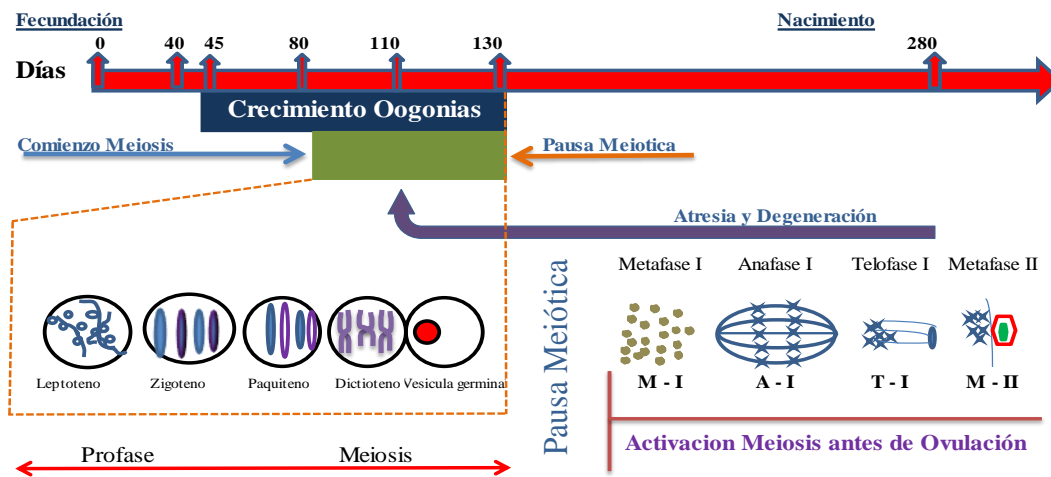


Figura 1: Etapas de Ovogénesis.

Fuente: Franchi *et al.*, 1962

### 2.1.3 Foliculogénesis

Los folículos primordiales están constituidos por un ovocito primario rodeado por una capa de células foliculares planas, el folículo mide de 25 – 30 mm de diámetro. Los folículos primordiales inician su desarrollo o crecimiento, las células modifican su desarrollo a células cúbicas o cilíndricas con gran actividad mitótica dispuestas en una sola capa alrededor del ovocito.

Thibault *et al.* (1987) Indican que la influencia sobre el crecimiento y la mitosis del ovocito es por las hormonas gonadotropinas hipofisiarias, sin intervención de las células de foliculares que rodean al ovocito. Las células epiteliales se multiplican y crecen disponiéndose en varias capas constituyendo el folículo secundario. Las células epiteliales secretan mucopolisacáridos, influenciadas por hormonas, se disponen alrededor del ovocito formando la zona pelúcida (ZP).

El núcleo del ovocito está en reposo, pero el citoplasma está en una intensa actividad, cargándose a través de las células que rodean al ovocito de productos nutritivos. Alrededor del folículo se constituyen las tecas, que son una barrera de tejido conjuntivo, que en el siguiente estadio completarán su formación.

Las células foliculares por estímulo de la FSH hipofisiaria secretando sustancias, que se van a acumular rodeando al folículo formando las células de la granulosa y el antro folicular llegando al estado de folículo De Graff.

#### **2.1.4 Maduración del ovocito**

La maduración de los ovocitos comprende dos partes: a) Un primer período de crecimiento y b) un período final de preparación nuclear y citoplasmática, requisito para una fecundación y desarrollo embrionario.

Cuando el folículo antral alcanza un tamaño de 1,8 mm en la vaca, termina el crecimiento del ovocito (145 – 150  $\mu\text{m}$  en vaca, Motlik y Fulka, 1986) y este está capacitado para reanudar la meiosis.

La progresión desde el estado de dictioteno hasta la metafase de la segunda división meiótica concluiría con la maduración nuclear. Pocas horas antes de la ovulación por la descarga de la LH, se activa de nuevo la meiosis, desintegrándose la vesícula germinal, continuándose con la meiosis, llegándose a la extrusión del primer corpúsculo polar, se vuelven a detener la meiosis en la metafase 2ª división, que coincide con la ovulación.

Debido a las transformaciones de las organelas del ovocito, fundamentalmente de mitocondrias, gránulos corticales y retículo endoplasmático liso y rugoso (Hyttel, 1988), que son necesarias, para el progreso de la maduración y el bloqueo de la poliespermia, se alcanzaría la maduración citoplasmática.

El cumulo que rodea al ovocito se mucifica y expande y se pierde un gran número de las uniones intercelulares, entre las células granulosas y entre estas y el ovocito (Gap-junctions), lo que provoca una interrupción en el transporte iónico entre cúmulo y ovocito (Hyttel, 1988).

El inhibidor de la maduración de los ovocitos (OMI), el AMP-Cíclico, el factor de las células de las granulosas (GCF), el GMP-Cíclico, fosfatidil-serina, etc. Serian algunas de



las sustancias que serían responsables de la inhibición de la maduración del ovocito (Illera, 1992).

El pico de la hormona luteinizante (LH), influye en la ovulación y también en los cambios en el ovocito y en el folículo en la vaca, la ovulación ocurre unas 24 horas después del pico de la LH y en este período de tiempo de ovocito bovino completa su maduración, tanto nuclear como citoplasmática (Illera, 1992).

Después de la ovulación, el ovocito que llega al oviducto y es transportado, por los cilios del oviducto, hasta donde sería fecundado por el espermatozoide, allí esperará a los espermatozoides en el estadio de la metafase II. La meiosis se reanuda con la fecundación, liberándose, en ese momento, el segundo corpúsculo polar, como señal de haber terminado completamente las dos divisiones del proceso meiótica, como se indica en la Tabla 1.

## **2.2 OBTENCIÓN DE OVOCITOS**

La obtención de ovocitos se realiza en diferentes estadios de maduración y una variedad de sistemas, agrupándose de la siguiente manera:

### **2.2.1 Ovocitos post- ovulatorios.**

Son ovocitos que han madurado in vivo en el propio tracto genital de la hembra. Se localizan en el oviducto después de la ovulación. El intervalo entre ovulación y el tiempo de recogida no debe ser mayor a 12 horas.

**Tabla 1: Descripción morfológica de los estadios meióticos durante la maduración de los ovocitos bovinos.**

Tiempo * (h)	Estado Meiótico	Descripción Morfológica
0	GV	Núcleo intacto membrana nuclear presente. A veces el nucléolo. Cromatina a veces condensada.
6 – 10	GVBD	Desaparición de la vesícula germinal. Desintegración de la membrana nuclear. Visualización de los primeros cromosomas.
10 – 12	DIACINESIS	Los cromosomas están condensados en el lugar del núcleo.
12 – 16	METAFASE I	Los cromosomas se colocan ordenadamente en la zona ecuatorial formando el Huso acromático.
16 – 18	ANA-TELOFASE I	Los cromosomas se segregan hacia los polos del Huso acromático.
19 – 24	METAFASE II	Cromosomas condensados en el segundo Huso acromático y presencia del primer corpúsculo polar.

Fuente: Hyttel *et al.*, 1986. \* Tiempo en horas tras el pico de la LH.

### 2.2.2 Ovocitos pre – ovulatorios.

Los ovocitos son inmaduros. Hay dos tipos de ovocitos preovulatorios, los que casi han completado su maduración y les falta, un corto espacio para terminar la misma y aquellos ovocitos foliculares que son totalmente inmaduros.

Ovocitos pre-ovulatorios se obtienen mediante la punción de los folículos ováricos. El grado de maduración de los ovocitos recogidos depende del método de recogida empleado.

a. Ovocitos obtenidos próximos al momento de la ovulación. Cuando los ovocitos casi han completado su maduración en el propio folículo ovárico, la técnica más utilizada para obtener es la aspiración de los folículos preovulatorios, en animales sometidos en tratamientos de superovulación (Leibfried-Rutledge *et al.*, 1986). El acceso a los ovarios

puede hacerse tras el sacrificio del animal, mediante laparotomía *In vivo* o incluso con ayuda de un laparoscopio (Sirard *et al.*, 1985).

b. Ovocitos inmaduros, se obtienen de los ovarios de hembras sacrificadas del camal, que es la forma más común de obtener ovocitos inmaduros. A través de la técnica de punción y aspiración de folículos antrales de un diámetro de 2 mm a 8 mm, se obtienen los ovocitos, que tras varios procedimientos de selección y lavado se introducen en medios de cultivo para su maduración *in vitro*; se puede llegar a obtener gestaciones en hembras receptoras.

## **2.3 FACTORES QUE INFLUYEN EN LA MADURACIÓN *in vitro***

### **2.3.1 Obtención de ovarios y ovocitos.**

#### **2.3.1.1 Obtención de ovarios**

Los ovarios son de vacas beneficiadas en el camal, inmediatamente después de que el animal ha sido beneficiado siendo hábil hasta 30 minutos después del beneficio (Sirard *et al.*, 1992), sin tener en cuenta el ciclo estral del animal. El transporte se hace en soluciones salinas (cloruro de sodio) con antibióticos. El tiempo que transcurre desde la recogida de los ovarios hasta el cultivo de los ovocitos debe oscilar entre 2 y 5 horas, aunque Yang *et al.*, (1990), indican que después de 8 horas desde la recogida de ovarios todavía se puede conseguir la maduración de ovocitos, siempre que estén a una temperatura mayor a 24 °C. Los ovarios deben provenir de animales jóvenes para que las posibilidades de encontrar folículos atrésicos y ovocitos degenerados sean menores (Gordon, 1990).

#### **2.3.1.2 Selección de folículos**

La selección de folículos antrales, de diámetro comprendidos entre 2 y 8 mm (Pavlov *et al.*, 1992) son los indicados para ser aspirados; ya que los folículos menores de 2 mm de diámetro contienen un alto porcentaje de ovocitos incompetentes o atrésicos, mientras que los mayores de 10 mm presentan un mayor número de ovocitos degenerados.

Lonergan *et al.*, (1990) señalan que los folículos con diámetro de 2 mm a 6 mm, permiten una mayor tasa de recuperación de ovocitos (nº de ovocitos obtenidos / nº folículos aspirados) aptos para el cultivo.

### **2.3.1.3 Obtención de los ovocitos**

Se aspiran los folículos de 2 a 6 mm de diámetro, utilizando agujas estériles 18 G, conectadas a jeringas estériles de 5 ml. Otro método consiste en la disección de los ovarios; este método nos da un mayor número de ovocitos y tiene la ventaja de que no daña a las células del cúmulus.

El producto de la aspiración se introduce a un tubo cónico para que sedimenten los ovocitos o en placas Petri de donde se recogen. Posteriormente, se pasan varias veces por placas de lavado (Fukui, 1990) con objeto de eliminar elementos foliculares, que impiden o dificultan la maduración (líquido folicular, células de descamación, sangre, adherencias, etc.).

### **2.3.2 Selección y clasificación de los ovocitos**

De acuerdo a su morfología podemos saber su capacidad de continuar la meiosis y garantizar un buen comportamiento en su maduración. La selección se efectúa por 2 criterios:

a. Por el citoplasma del ovocito; debe ser un citoplasma granuloso, fino y uniforme, no debe tener un espacio perivitelino ni vacuolizaciones.

b. Aspecto y morfología del cúmulo celular que lo rodea debe encontrarse compacto y sin aglutinaciones. Laurincik (1992) señala que se produce una mayor tasa de maduración *in vitro* cuando se seleccionan ovocitos que presentan las células de la corona radiada bien diferenciadas del resto de cúmulo celular que rodea al ovocito.

La clasificación de los ovocitos para su cultivo *in vitro* se basa en el número de capas de cúmulo que les rodean y el citoplasma. Leibfried y First (1979) clasificaron indicando que el cúmulo debería estar compacto y sin aglutinaciones. Como se indica en la Tabla 2.

**Tabla 2: Clasificación de ovocitos por número de célula de cúmulos y citoplasma**

<b>Tipos de Ovocitos por Numero de Células de Cúmulos y Citoplasma</b>		
<b>Tipo</b>	<b>Nº célula de cúmulo</b>	<b>Citoplasma</b>
A	De 4 a más capas	Homogéneo y transparente
B	De una a tres capas	Homogéneo con zonas periféricas oscuras
C	Denudados	Irregular con zonas oscuras
D	Células expandidas	Irregular con zonas oscuras

Fuente: Leibfried y First, 1979.

## **2.4 MÉTODOS DE MADURACIÓN *in vitro***

### **2.4.1 Medios de maduración**

Actualmente existe una gran variedad de medios de maduración cuya finalidad es mantener los requisitos metabólicos y energéticos del ovocito fuera del folículo ovárico. Estos medios están constituidos por aminoácidos, sales orgánicas, vitaminas, nucleótidos, etc. Los mejores resultados en la maduración *in vitro* se obtienen con la utilización de los medios M-199 (Rose y Bavister, 1992), TALP (Liebfried-Rutledge *et al.*, 1986). La importancia del medio de cultivo para maduración de los ovocitos *in vitro* es tal que, según algunos autores, condiciona el éxito de los sistemas de fecundación y posterior desarrollo *in vitro* de los embriones (Rose y Bavister, 1992).

### **2.4.2 Modificación de los medios de cultivo**

Se puede suplementar a los medios de maduración con sustancias que favorezcan en la capacidad de maduración del ovocito *in vitro*, entre los cuales se cuenta con: sueros, compuestos energéticos, hormonas, factores de crecimiento, etc.

**a. Sueros.** Para cubrir la necesidad de nitrógeno exógeno de origen proteico, por lo que al medio de maduración se complementa con suero fetal bovino (SFB). Existen otros sueros como el suero de vaca en estro (SVE), o como un derivado de este llamado albúmina sérica bovina (BSA).

Leibfried-Rutledge *et al.*, (1986) indican mejores resultados de maduración al usar el SFB, debido a que el BSA no puede soportar el gasto energético que supone la expansión del cúmulo celular durante la maduración. Los sueros, tanto el SFB como el SVE, se inactivan antes de su utilización, a 56°C durante media hora con el fin de desnaturalizar las proteínas del complemento, ya que estas pueden causar reacciones inmunes que impiden el desarrollo y crecimiento normal del ovocito.

Schellander *et al.*, (1990), demuestran que el SVE favorece notablemente la maduración *In vitro*, utilizando concentraciones del 20 por ciento, que además, producen expansión completa del cúmulo celular. Pero Kim *et al.*, (1990), señalan que la concentración más efectiva, en los sistemas de maduración y fecundación *In vitro*, es de 10 por ciento de SVE en el medio de maduración.

**b. Compuestos energéticos.** Junto a otras sustancias pueden ser transferidos, a través de las uniones intercelulares que relacionan al ovocito con las células del cúmulo. Se debe suministrar sustancias que permitan al cúmulo la formación de estos complejos energéticos al inicio de la maduración del ovocito. Los medios se suplementan con piruvato, lactato y oxalato sódico, glutamina, glucosa y bicarbonato de sodio. El bicarbonato de sodio tiene un doble efecto por un lado mantiene los niveles óptimos de pH, y por otro favorece la síntesis de piruvato sódico en las células del cúmulos.

### 2.4.3 Condiciones del cultivo *In vitro*

Debemos de brindar condiciones similares a la que está expuesto el ovocito dentro del líquido folicular; tales como las condiciones fisicoquímicas de:

**a. Temperatura.** Los márgenes de temperatura de 37 a 41°C, permiten la maduración *in vitro* de los ovocitos bovinos (Lenz *et al.*, 1983), aunque la temperatura óptima es de 39°C (Lenz *et al.*, 1983; Leibfried-Rutledge *et al.*, 1986).

**b. Presión Osmótica.** La presión osmótica recomendable en los medios tienen osmolaridades de 285 a 295 mOsmM.

**c. pH.** Este se regula en el medio de maduración debido a la concentración de CO<sub>2</sub> y bicarbonato de sodio, el pH oscila entre 6,8 y 7,4. Pero el pH óptimo es 7,2 a 7,4. (Sato *et al.*, 1977; Leibfried-Rutledge *et al.*, 1986). Mantener el pH del medio constante y a niveles fisiológicos es un factor decisivo, ya que muchos sistemas enzimáticos del ovocito bovino solo actúan a pH muy limitado, inhibiéndose su actividad por debajo de pH 6,7 y por encima de pH 7,6. El pH se regula, en el medio de maduración, gracias a la concentración de CO<sub>2</sub> y de bicarbonato sódico.

**d. La atmósfera gaseosa.** Es muy importante para el medio de maduración, ya que tiene un rol decisivo en varias funciones metabólicas y del pH intra y extracelular (Bavister, 1987). Se emplean dos tipos de muestras gaseosas: 5 por ciento de CO<sub>2</sub> en el aire (Wiemer *et al.*, 1991) y 5 por ciento de CO<sub>2</sub>, 5 por ciento de O<sub>2</sub> y 90 por ciento de N<sub>2</sub> (Pavlov *et al.*, 1992), en ambos casos con humedad relativa cerca al 100 por ciento.

**e. Duración.** La mayoría de los autores establecen un período de maduración de 24 a 27 horas, en el cual consideran completada la maduración *in vitro* (Fukui, 1990).

#### **2.4.4 Sistemas de maduración *in vitro***

Hay varias metodologías y modificaciones de las técnicas de maduración de los ovocitos. Se consideran: el tipo de material en el que se va a madurar como: placas, tubos, etc., la colocación del cultivo, el número de ovocitos por medio y si se cultiva de manera estacionaria o con un ligero movimiento. (Whitten, 1971)

También hay dos tipos de cultivo de acuerdo al intercambio gaseoso. De los cuales se tienen: un cultivo en el cual no se permite el intercambio gaseoso con la atmósfera, mediante el cierre hermético y un segundo tipo de cultivo que se realiza manteniendo un intercambio gaseoso continuo. Sugie *et al.* (1987).

El segundo sistema de cultivo se divide en dos tipos de sistemas:

a. El sistema abierto, son aquellos recipientes en los que se coloca un volumen de medio de cultivo que esta en contacto directo con la atmósfera que le rodea. (Fukui, 1990) La desventaja de este sistema es que presenta una gran superficie de evaporación, lo que puede provocar una gran osmolaridad, al elevarse la concentración de sodio.

b. El sistema cerrado, o llamado también de Microgotas consiste en recubrir el medio de cultivo con aceites minerales, de tal manera que le impida la evaporación del medio pero se permite el intercambio gaseoso con la atmósfera. Consiste en colocar un determinado número de gotas, con un volumen de 50 a 100  $\mu$ l en una placa petri y recubrirlas, con aceite mineral. El agua no se evapora fácilmente, pero alguno de los componentes del medio puede ser soluble en el aceite; por ello, hay que equilibrarlo antes de que inicie el período de cultivo (Whitten, 1971). Permite una identificación individual de los ovocitos, minimiza los riesgos de contaminación y facilita el cultivo independiente de los ovocitos y una observación más fácil.

En cuanto al número de ovocitos que puede colocarse en el medio en el sistema abierto pueden ser de 20 a 30 ovocitos/ml de medio (Fukui, 1990); en el sistema de microgotas, se colocan 5 a 10 ovocitos/microgota (Rose y Bavister, 1992).

#### **2.4.5 Sustancias foliculares en la maduración *in vitro***

Para que pueda ocurrir la maduración de los ovocitos aislados de los folículos; no debe tener restos de líquido folicular ni de las células de granulosa, causantes de la pausa meiótica. Por lo tanto la adición de estos componentes foliculares en el medio de maduración *in vitro*, ya que influyen en el proceso de la maduración del ovocito (Wassarman, 1988).

**a. Líquido folicular.** Como se indicó que la adición de líquido folicular (LF) al medio de maduración inhibe la meiosis de los ovocitos en vacas (Sreenan *et al.*, 1970), al igual que el líquido folicular del porcino.



**b. Células de la granulosa.** A pesar de que estas células mantienen la pausa meiótica del ovocito *In vivo* (Dekel, 1989), hasta que ocurran los cambios en los niveles endocrinos que terminan con la ovulación. Pero la adición de cierta cantidad de células de la granulosa, al cultivo de maduración *in vitro*, favorecen en la maduración y en la fertilización *in vitro*. Este efecto está demostrado para la vaca (Fukui, 1990).

#### 2.4.6 Reguladores de la maduración *in vitro*

Entre los factores que intervienen en la maduración tanto *in vitro* como *In vivo* de los ovocitos se encuentran las hormonas y el sistema AMPc (Fukui *et al*, 1989).

**2.4.6.1 Hormonas.** Durante el crecimiento del folículo ovárico, se producen cambios debido a la secreción e influencia de las gonadotropinas, esteroides, factores de crecimiento entre otros, los que individual o colectivamente conllevan a la maduración del ovocito. La suplementación al medio de maduración con estas hormonas, tienen un efecto positivo en la maduración de los ovocitos en todas las especies (Leibfried y First, 1979).

**a. Gonadotropinas.** Estas incrementan las tasas de maduración en las diversas especies animales: oveja (Moor y Trounson, 1977), cerda (Yoshida *et al.*, 1992) y vaca (Zuelke *et al.*, 1990).

Zuelke y Brackett, (1990) señalan que la presencia de LH, en el medio de cultivo, provoca una mayor oxidación mitocondrial de la glucosa, en los ovocitos bovinos, lo cual favorece la maduración de los mismos.

La FSH no es imprescindible para la maduración del ovocito pero tiene influencia en la expansión del cúmulo celular. (Hensleig y Hunter 1985) han demostrado inducir la maduración de ovocitos en la vaca.

**b. Esteroides.** *In vivo* se sabe que la LH al llegar al pico provoca el aumento de estrógenos en el folículo preovulatorio. Los esteroides más utilizados en los medios de

maduración son el estradiol y la progesterona, describiéndose que la adición de ambos completa la maduración nuclear y citoplasmática (Fukui *et al.*, 1982).

Algunos autores indican que los medios de maduración que se suplementan con hormonas, estas no tienen los efectos esperados sobre la maduración y fecundación e indican que la adición de SVE presenta mejores resultados (Gordon, 1990).

**c. Otras hormonas.** La GnRH estimula la maduración de ovocitos en la rata. La adición de TSH (hormona estimulante de la tiroides) a medios de maduración *in vitro* aumenta la expansión del cúmulo y la tasa de maduración en ovocitos bovinos (Younis y Brackett, 1992). La prolactina (PRL) no presenta ningún efecto sobre la maduración y fecundación *in vitro* de bovinos (Younis y Brackett, 1992); pero en otras especies como el ovino y el porcino si favorece (Illera, 1992).

**2.4.6.2 Sistema AMPc.** El sistema que regula los niveles de adenosina mono fosfato cíclico (AMPc), en el interior del ovocito se encarga de mantener su núcleo en reposo meiótico (GV). En este mecanismo actúan varios factores cuyas acciones son las siguientes:

Hay dos enzimas: el adelinato-ciclasa eleva los niveles de AMPc intracelular, y la fosfodiesterasa (PDE) disminuye los niveles (Sirard *et al.*, 1992). El mecanismo intrínseco del proceso de desactivación y activación meiótica es la regulación ejercida por una proteínquinasa (PKC), la cual fosforoliza una proteína desconocida. Esta proteína es la encargada de mantener en reposo meiótico (GV). Este proceso depende de las concentraciones de AMPc. Cuando descienden los niveles intracelulares de AMPc en el ovocito también disminuyen los niveles de PKC, y la proteína se desfosforiliza, lo cual da como resultado la activación meiótica del ovocito (Bornslaeger *et al.*, 1986).

Sanbuissho *et al.*, (1992) indican que los altos niveles de AMPc, consecuencia de la inducción por las gonadotropinas, ocasionan rupturas de las uniones intercelulares entre el cúmulo y el ovocito, provocando que el flujo de AMPc se interrumpa activándose la meiosis.

Las moléculas de Adenosina e hipoxantina, que están contenidas en el líquido folicular de ovocitos inmaduros, inhiben la activación de la meiosis ovocito (Downs *et al.*, 1985).

## **2.5 DESCRIPCIÓN DEL OVOCITO, CRITERIOS DE MADURACIÓN.**

El ovocito en sus diferentes estados de crecimiento, presentan una morfología definida y característica a lo largo de su proceso de maduración. Estos cambios se muestran utilizando técnicas de tinción (Hyttel *et al.*, 1986).

**2.5.1 Morfología del ovocito inmaduro.** Presenta un núcleo grande, situado en la periferia, rodeado por la membrana nuclear y con un nucléolo apenas visible, en los ovocitos bovinos (Hyttel *et al.*, 1986). Este estado corresponde al dictiatio meiótico (GV).

Las organelas citoplasmáticas se distribuyen por todo el citoplasma de la célula. El espacio perivitelino (EPV) no existe o está muy pequeño y la zona pelúcida se encuentra atravesada por las prolongaciones de las células de la corona radiada, constituyéndose como uniones intercelulares. El ovocito inmaduro presenta un cúmulo celular compacto e incluso dificulta la visión del propio ovocito (Leibfried y First, 1979).

**2.5.2 Morfología del ovocito durante la maduración.** Al inicio de esta etapa hay cambios nucleares y citoplasmáticos que ocurren en períodos de tiempos. En ovocitos bovinos entre las 3 y 6 horas del comienzo de la maduración, comienzan los cambios en el núcleo del ovocito que culmina con la desaparición de la membrana nuclear. De 12 a 16 horas se llega al estadio de metafase I y de las 19 a 24 horas se produce la extrusión del primer corpúsculo polar al espacio perivitelino (EPV), llegando rápidamente al estadio de metafase II, donde se detiene nuclearmente la meiosis, a la espera de que ocurra la fecundación (Hyttel *et al.*, 1986).

Los cambios citoplasmáticos durante esta etapa hay un incremento de la actividad de síntesis protéica y reordenamiento de los sistemas de microtúbulos, debido a la intensa actividad cromosómica (Hyttel *et al.*, 1986). Las uniones intercelulares empiezan a retraerse a las 3 horas de iniciada la maduración y a las 18 horas solo quedan restos en el espacio perivitelino, quien conforme va madurando el ovocito va creciendo (Xu *et al.*, 1986). También en este tiempo la expansión del cúmulo es máxima.

**2.5.3 Morfología del ovocito maduro.** El ovocito al alcanzar su maduración las células del cúmulus han alcanzado la expansión total y está presente el primer corpúsculo polar en el espacio perivitelino. A nivel nuclear, los cromosomas presentan la configuración de metafase II.

Hyttel (1988) La maduración nuclear finaliza a las 24 horas de haber iniciado la maduración, pero los cambios citoplasmáticos se completan a las 30 horas de haberse iniciado la maduración. Estos cambios incluyen dos procesos: la colocación de los gránulos corticales a la periferia, situándose bajo de la membrana plasmática (Ducibella *et al.*, 1988) y el agrupamiento de mitocondrias y retículo endoplasmático rugoso (RER) en cisternas de gran tamaño (De Loos *et al.*, 1992). En esta fase final de la maduración sigue existiendo una gran actividad de síntesis protéica con el fin de preparar al ovocito, nuclear y citoplasmáticamente, para la fecundación (De Loos *et al.*, 1992).

Estos fenómenos descritos corresponden tanto en la maduración de ovocitos madurados *In vivo* como *in vitro* (Hyttel, 1988). Por lo tanto los criterios para determinar la maduración *in vitro* son:

- a. Extrusión del primer corpúsculo polar y llegada al estadio de metafase II.
- b. Expansión y mucificación del cúmulo celular.
- c. Traslado de los gránulos corticales a la periferia del ovocito
- d. Desaparición de las uniones intercelulares.

## **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **3.1 LOCALIZACIÓN**

El presente estudio se llevó a cabo en el Laboratorio del Centro de Investigación y Enseñanza en Transferencia de Embriones (CIETE), departamento de Lima, ubicado en las instalaciones de la Universidad Nacional Agraria La Molina.

### **3.2 DE LOS ANIMALES**

Para el presente trabajo de investigación se utilizó 83 vacas criollas de descarte beneficiadas en el Camal de Yerbateros, departamento de Lima, distrito de Ate; de las cuales se recuperaron ambos ovarios; haciendo un total de 166 ovarios post mortem.

### **3.3 MATERIALES Y EQUIPOS**

#### **3.3.1 Recolección de ovarios.**

El transporte de los ovarios recuperados desde el camal hasta el laboratorio se efectuó en un termo (Thermos) de 1 litro de capacidad conteniendo 350 ml de Cloruro de sodio al 0.9 por ciento y se le agregó 5 ml de antibiótico y antimicótico Agtech® (Anfotericina-B, Penicilina G y estreptomycin) a una temperatura de 35°C, para mantener la temperatura adecuada; y para su disección y limpieza se emplearon tijeras rectas, previamente esterilizadas en estufa seca (Binder-Minitub) y guantes de látex.

##### **a. Identificación de ovocitos**

La punción y aspiración de los folículos ováricos se llevó a cabo utilizando jeringas estériles plásticas, desechables, de 5 ml (B-Braun), conectadas a agujas (Terumo) de 18 Gauge (1,2 X 40 mm). El líquido recuperado de los folículos se colocó en tubos cónicos de centrifuga estériles (Falcon-BD) de 50 ml, para que sedimente los ovocitos. Luego con una micropipeta de 1000 µl (Eppendorf) se procedió a aspirar el sedimento y fue colocado en placas Petri estériles de poliestireno de 100 X 15 mm, (Falcon); y se realizó la

búsqueda y clasificación de ovocitos. Luego de haber realizado la clasificación, los ovocitos se trasladaron a placas de 35 mm (Falcon) conteniendo medio de maduración *in vitro* que habían sido preparados con dos horas de anticipación. Durante todo el proceso los ovocitos se manipularon siempre utilizando micropipetas Eppendorf con puntas desechables de 10  $\mu$ l, y para el proceso de denudación de las células del cúmulo antes de su fijación se utilizaron micropipetas de 40  $\mu$ l.

La localización, selección y fijación de los ovocitos, así como su paso a través de las dos placas de lavado, se llevaron a cabo empleando un estereoscopio (Meiji), con oculares de 10 aumentos (10x de magnificación para localizar y lavar los ovocitos y 20x para su selección).

Durante el tiempo necesario para la localización, lavado y selección de los ovocitos, estos se mantuvieron sobre una platina caliente (Lab-Line) a 38 °C, con el fin de evitar cambios de temperatura.

## **b. Cultivo**

El cultivo *in vitro* se realizó en la incubadora de CO<sub>2</sub> (Nuair) que proporcionó, de manera constante, un ambiente de 38 °C, 5 por ciento de CO<sub>2</sub>, 21 por ciento de O<sub>2</sub> y 90 por ciento de humedad.

Medios de cultivo se pesaron en una balanza de precisión (AND HR-120 Vegatronic Perú). Para la preparación de los medios se utilizó agua bidestilada y desionizada y para el lavado del material se empleó agua destilada.

El ajuste de pH de los medios se realizó con un pH-metro (Oakton). La osmolaridad de los distintos medios de cultivo se determinó mediante osmómetro (Minitub).

En los medios de cultivo se utilizaron los siguientes sueros: suero fetal bovino – SFB (SIGMA), Albumina de suero bovino libre de ácidos grasos - BSA FAF (SIGMA).

Los medios de cultivo se esterilizaron mediante filtros de membrana estériles 0,22  $\mu$  (Millipore), conectados a jeringas plásticas también estériles sin goma (B-Braun).

La conservación de los medios de cultivo y sueros se realizó en viales y tubos de ensayo (Pyrex), esterilizados previamente en autoclave, en las condiciones anteriormente mencionadas.

El almacenamiento y conservación de medios se realizó en un refrigerador (Coldex) a 4 °C, y en un congelador (Double Action) a una temperatura de -20°C.

La preparación de medios requirió de condiciones de asepsia, tanto para el pesaje y cargado de viales, para lo cual se utilizó una cabina de flujo laminar (Nuaire) provista de luz ultravioleta.

### **c. Fijación, tinción y lectura**

Para la fijación y tinción de los ovocitos se utilizaron portaobjetos de cristal de 26 x 76 mm y cubreobjetos de 18 X 18 mm (WF medical).

Para determinar las configuraciones cromosómicas de los ovocitos, tras su fijación y tinción, se utilizó un microscopio con contraste de fases (Optima) a 120, 200 y 400 aumentos.

El material de laboratorio utilizado: probetas, beacker de 100 ml, pipetas de cristal de 1, 2, 5 y 10 ml etc.

## **3.3.2 Preparación de medios**

### **3.3.2.1 Medio de colección de ovarios.**

El medio de transporte permitió transportar a los ovarios desde el lugar del beneficio hasta el laboratorio. El medio de colección estuvo compuesta de cloruro de sodio al 0.9 por ciento y se agregó 5 ml de antibiótico y antimicótico Agtech ® (Anfotericina-B, Penicilina G y Estreptomina).

### **3.3.2.2 Medio de aspiración de ovocitos.**

El medio de aspiración utilizado fue la solución de fosfato buffer salino modificado (MDPBS).

### **3.3.2.3 Medio de maduración**

El medio utilizado fue B-199, Suero Fetal Bovino (SFB), FSH, LH, Estradiol, Aditivo A y Factores de Crecimiento.

Los medios se ajustaron a pH 7,4 y a una osmolaridad de 295 +/- 5 mOs/L. Los sueros y los factores de crecimiento, se incorporaron a los medios el día de cultivo *in vitro*. Los medios se equilibraron colocándolos en la incubadora para que obtenga la temperatura de 38.5 °C, humedad y saturación de CO<sub>2</sub>, durante dos horas como mínimo en la incubadora de CO<sub>2</sub>.

## **3.4 MÉTODOS**

En la preparación de los medios se utilizó agua bidestilada y desionizada. El pH se ajustó a 7,4 la osmolaridad a 295 +/- mOs/L y se esterilizó a través de un filtro de membrana, con un diámetro de porosidad de 0,22 µl, todo el proceso se realizó en la cabina de flujo laminar.

Posteriormente, se almacenaron en frascos de vidrio estériles de 10 ml, a 4°C hasta el momento de su utilización.

El suero utilizado para la maduración *in vitro* fue SFB (SIGMA), inactivado por calor. Se almacenaron en alícuotas a -20°C en frascos estériles, hasta el día en que se usó.

Los factores de crecimiento utilizados fueron: factor de crecimiento epidermal – EGF (0,1 mg, SIGMA) y factor de crecimiento insulínico – IGF (10 µg, SIGMA), se solubilizaron con 5 ml de M-199, sin suero, se diluyeron y las alícuotas se colocaron en viales estériles (Eppendorf). Las alícuotas se congelaron posteriormente a -20°C hasta el momento de su uso. Estos productos congelados tenían una validez máxima de 3 meses.



### **3.4.1 Recolección de ovarios en animales beneficiados.**

Los ovarios se obtuvieron en el camal de Yerbateros de vacas criollas recién beneficiadas, que inmediatamente después de la apertura abdominal se procedió a extraerlos previa eliminación de adherencias y luego colocados en un termo que contenía la solución de Cloruro de sodio al 0.9 por ciento a una temperatura de 35°C. El traslado al laboratorio se hizo en un lapso menor de 3 horas. El transporte de los ovarios del camal al laboratorio se efectuó en un termo (Thermos) de 1 litro de capacidad, con el fin de mantener la temperatura adecuada. Para la disección y limpieza se empleó tijeras rectas, previamente esterilizadas en estufa (Minitub-Binder) y guantes de látex.

### **3.4.2 Método de aspiración**

Los folículos cuyo diámetro estaban comprendidos entre 5 y 8 mm, fueron aspirados utilizando agujas hipodérmicas 18 G, y jeringas plásticas de 5 ml con fosfato Buffer Salino (PBS). El líquido folicular aspirado se depositó en tubos de centrifuga de 50 ml, dejándolos en reposo 5 minutos en baño María, con el fin de favorecer la precipitación del sedimento que estaba compuesto de ovocitos, células foliculares, células de descamación, etc.

Transcurrido este tiempo, el sedimento se aspiró con una pipeta y fue depositado en una placa Petri de 90 mm de diámetro, junto con una proporción igual de medio de lavado (M-199).

### **3.4.3 Clasificación de Ovocitos**

Todos los ovocitos considerados aptos para la maduración *in vitro* poseían un citoplasma con un granulado fino y uniforme.

El citoplasma llenaba completamente el espacio delimitado por la zona pelúcida.

Para la evaluación morfológica se utilizó la clasificación señalada por Leibfried *et al.*, (1989) Tabla 3.

**Tabla 3: Clasificación Morfológica de los ovocitos por Número de células del cúmulus y calidad de citoplasma.**

<b>Tipo</b>	<b>Nº de Células Cúmulus</b>	<b>Citoplasma</b>
A	Capas múltiples, compactas de células de cúmulus (>4)	Homogéneo y transparente
B	Capas múltiples, compactas de células de cúmulus (1 - 3)	Homogéneo con zonas periféricas oscuras
C	Denudados	Irregular con zonas oscuras
D	Células expandidas	Irregular con zonas oscuras

Fuente: Liebfried (1989).

### 3.4.4 Condiciones del medio de maduración

Los ovocitos se cultivaron en placas Petri estériles, de 60 mm de diámetro. El medio de maduración se dispone en placas en forma de microgotas (200 µl).

Posteriormente, las microgotas se cubrieron totalmente con aceite mineral 8 ml y se colocaron, durante un mínimo de dos horas, en la incubadora de CO<sub>2</sub> antes de iniciar el período de maduración *in vitro*. Este procedimiento tuvo como fin equilibrar el medio de cultivo con las condiciones ambientales en la incubadora. En cada microgota se colocaron 30 ovocitos del mismo tipo de acuerdo a la morfología.

La maduración *in vitro* se llevó a cabo en la incubadora de CO<sub>2</sub>, con una temperatura de 38°C, 5 por ciento de CO<sub>2</sub>, 21 por ciento de O<sub>2</sub> y 90 por ciento de humedad relativa durante un período de 24 horas.

### **3.4.5 Fijación y Tinción de ovocitos**

Los ovocitos seleccionados se extrajeron del medio de maduración y se lavaron con PBS, ya que la orceína que se utilizó para la tinción pudo hacer precipitar ciertos componentes del M-199. Los ovocitos se aspiraron repetidamente, utilizando una micropipeta de 40  $\mu$ l, con el objeto de eliminar mecánicamente las células del cúmulus, proceso que se llama denudación.

Después se introdujo los ovocitos denudados en una placa de 30 mm con la mezcla fijadora Carnoy (metanol absoluto-ácido acético glacial, 3:1), manteniéndolo así durante 48 horas y en refrigeración 4 °C.

Pasado este tiempo se extrajo los ovocitos y se montaron en el portaobjetos se depositó una pequeña gota de PBS en la que van incluidos de 10 a 15 ovocitos, y sobre ellos se colocaron el cubreobjetos, que se presionó ligeramente hasta contactar con la gota.

Pasado este tiempo, las preparaciones estaban listas para su tinción. El colorante utilizado fue la orceína acética que se preparó disolviendo 2 gramos de colorante en 45 ml de ácido acético glacial llevando la mezcla a ebullición. Una vez disuelto el colorante, la solución se enfrió completándose con agua desionizada y bidestilada en una proporción 4,5:5,5 La solución final se filtró (0,2  $\mu$  de diámetro de poro) antes de almacenarla conservando la solución a 4 °C. Se pudo utilizar durante 3 meses.

Los portaobjetos se colocaron bajo el estereoscopio. Se tomó colorante con una jeringa de 1 ml, conectada a una aguja de 25 G, y se depositaron unas gotas en uno de los extremos del portaobjetos; de esta manera el colorante paso de poco a poco, por capilaridad, a través de todo el espacio entre portaobjetos y cubreobjetos hasta llegar al extremo opuesto.

La observación de las preparaciones y la valoración de los resultados se realizó en el microscopio a 40x en campo claro y con contraste de fases.

### 3.4.6 Criterios de Maduración *in vitro*

El criterio de expansión del cúmulo (Lorenzo, 1992), como se describe y muestra en el figura 2; fue el siguiente:

- Expansión nula. No existe expansión apreciable del cúmulo.
- 1. Pequeña expansión de aproximadamente un diámetro del ovocito.
- 2. Expansión apreciable, de unos dos diámetros del ovocito.
- 3. Expansión máxima, de más de tres diámetros del ovocito, e incluso de las células de la corona radiada.

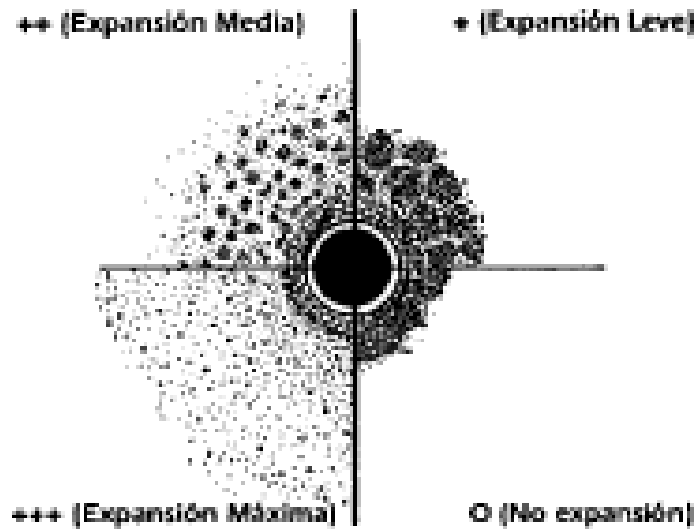


Figura 2: Expansión de cúmulo

Fuente: Lorenzo, (1992)

Los ovocitos valorados por la expansión de su cúmulo se fijan y se tiñen con orceína acética para visualizar su estado de maduración nuclear.

Tras la fijación y tinción de los ovocitos se evalúan las siguientes configuraciones meióticas, según los criterios de Xu *et al.*, (1986) y de Sirard *et al.*, (1992).

**a. Vesícula germinal (GV).** El núcleo del ovocito está intacto. La membrana nuclear es visible y la cromatina esta solamente dispuesta alrededor del nucléolo, que habitualmente también está presente. En el resto del núcleo hay pocas zonas que se tiñen con orceína, como la cromatina que se distribuye en grumos.

**b. Diacinesis (DIAC).** Desaparece la membrana nuclear y el nucléolo, lo que constituye la degradación y desaparición de la vesícula germinal (GVBD). En algunas oportunidades, se observa la membrana nuclear de forma difusa, y los cromosomas bivalente comienzan a contraerse e individualizarse.

**c. Metafase 1 (M-I).** Los cromosomas se encuentran condensados e individualizados, al máximo, y generalmente agrupados en masa y aglutinados en la zona ecuatorial del ovocito.

**d. Anafase 1 (A-I).** Ocurre cuando los cromosomas, que se encuentran bajo división o segregación, se disponen a lo largo del huso acromático.

**e. Telofase 1 (T-I).** La posición de los cromosomas es terminal, en ambos polos del huso acromático. A veces se puede observar la membrana del primer corpúsculo polar, aunque el huso acromático este todavía presente.

**f. Metafase II (M-II).** En este estadio los cromosomas están contraídos y situados en el ecuador del segundo huso acromático. Además, también se visualizan los cromosomas correspondientes al primer corpúsculo polar.

**g. Degenerados (DEG).** Todas aquellas estructuras nucleares que se tiñen con la orceína, que se encuentran dispersas e incompletas, o grandes zonas vacuolizadas y fragmentadas en el citoplasma del ovocito, son consideradas como degenerativas.

### **3.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.**

Para comparar el porcentaje de ovocitos que alcanzaron el estado de maduración se aplicó el Test chi-cuadrado  $X^2$  de independencia (Montgomery, 1991).

Para los análisis estadísticos se utilizó el procedimiento S.A.S. (Sistema de Análisis Estadístico versión 8). En todos los casos se consideraron significativas las diferencias con  $P < 0,05$ .

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 CANTIDAD DE FOLÍCULOS Y RECUPERACIÓN DE OVOCITOS POR OVARIO

#### 4.1.1 Cantidad de folículos aspirados por ovario.

En este estudio, como muestra la Tabla 4, se seleccionaron y aspiraron 1,653 folículos de 166 ovarios, lo que produjo una cifra media de 10.26 folículos por ovario. En total se recuperaron 1,228 ovocitos, lo que equivale a 72.66 por ciento respecto del número de folículos ováricos aspirados.

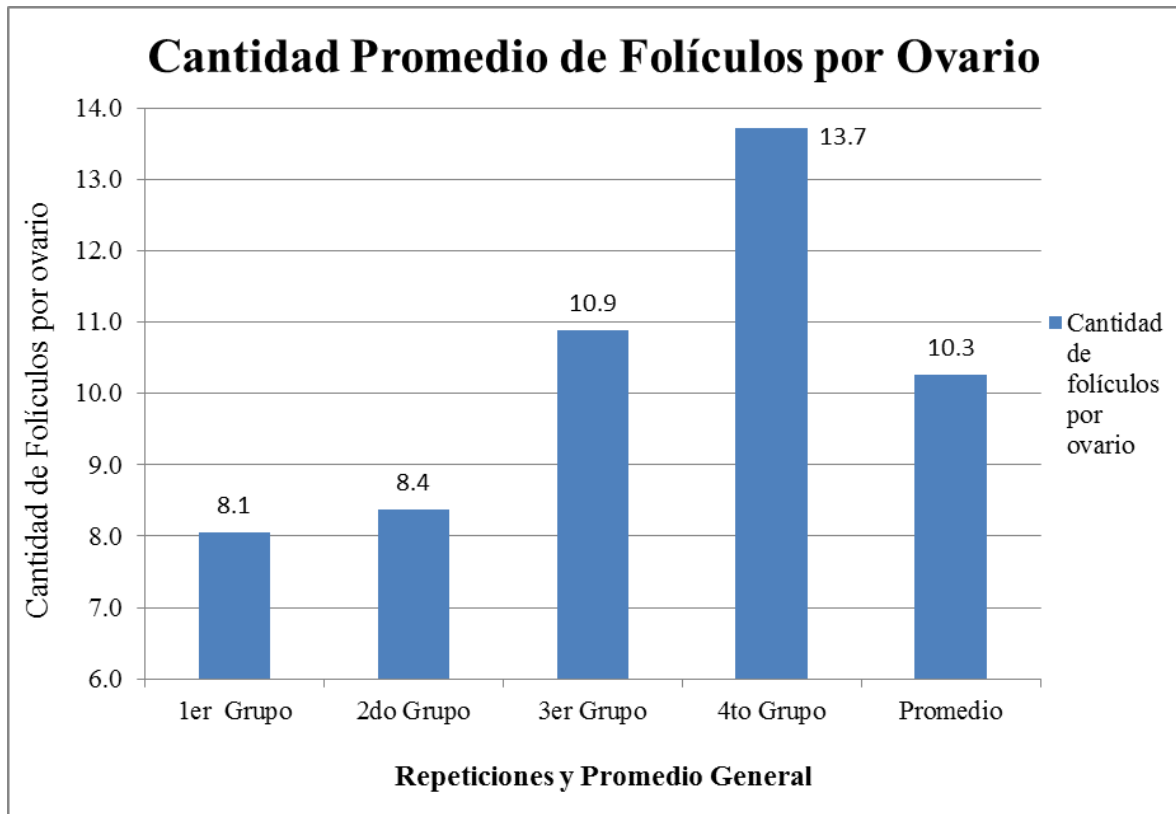
**Tabla 4: Recuperación de ovocitos**

Nº de Ovarios	166
Nº de folículos aspirados	1653
Nº de ovocitos recuperados	1228
Nº de folículos por ovario	10.26

Fuente: Elaboración Propia

En el presente trabajo se aspiraron en promedio 10.26 folículos, por ovario. Este resultado fue ligeramente mayor de acuerdo con los valores obtenidos por otros autores 8,3 ovocitos/ovario (Herlerr *et al.*, 1992); 6,3 ovocitos/ovario señalado por otros Pavlov *et al.*, 1992); aunque también fue ligeramente inferior al indicado en otros trabajos, que han obtenido un número de 14,6 ovocitos/ovario (Lonergan *et al.*, 1991); la mayoría de estos estudios indican que existe una marcada variabilidad en el número de folículos aspirados por ovario, que también se presentó en este trabajo, debido probablemente a las diferentes procedencias, estación del año y condiciones de los animales que llegan a ser beneficiados en el camal. Figura 3.

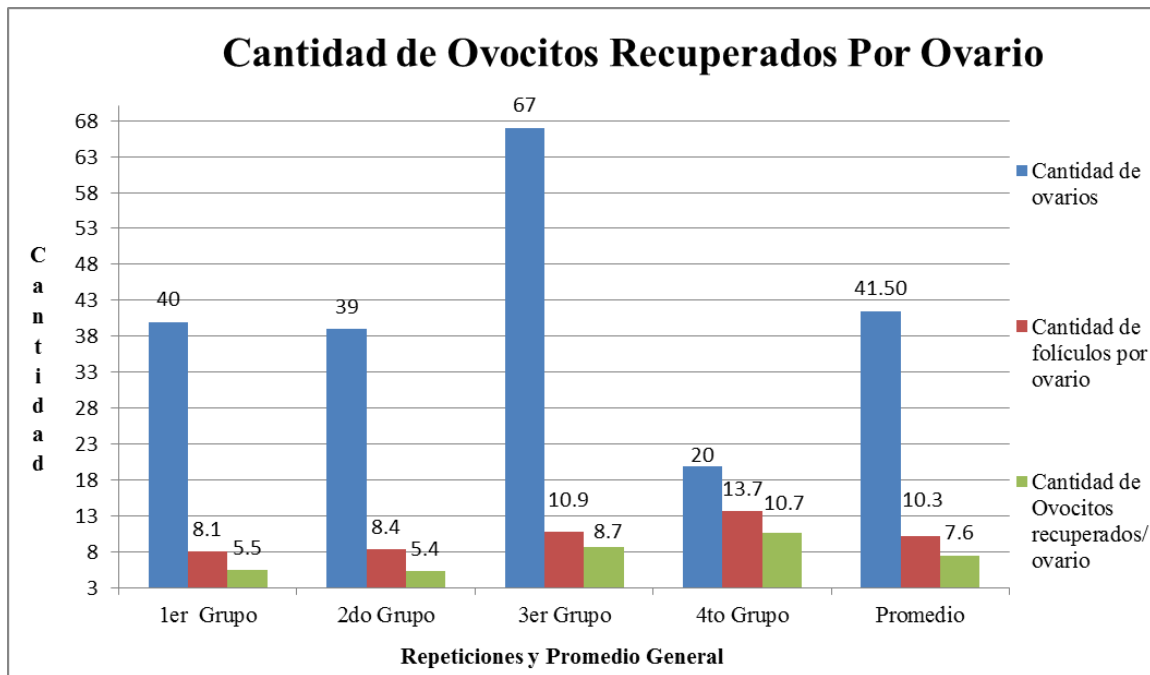
Figura 3: Cantidad Promedio de Folículos por Ovario.



#### 4.1.2 Cantidad de ovocitos recuperados por ovario.

De 166 ovarios se aspiraron 1, 652.6 folículos de los cuales se recuperaron un total de 1, 228 ovocitos de las cuatro categorías (A, B, C Y D), y se tuvo un promedio de recuperación de 7,6 ovocitos/ovario lo que nos dio un porcentaje de 72.66 por ciento, comparando con Hernández-Fernández et al., (2010) que obtuvieron un promedio de ovocitos por ovario de 4,58 y 7,03, para la técnica de aspiración y slicing, y Gómez (2012) que obtuvo un promedio 4,26 y 5,32 para la misma técnica. Figura 4.

Figura 4: Cantidad de ovocitos recuperados por ovario.



#### 4.1.3 Cantidad de ovocitos recuperados por categoría.

De los 1, 228 ovocitos recuperados se obtuvo: Categoría A, 196 ovocitos (15,96 por ciento); categoría B, 168 ovocitos (13,68 por ciento); Categoría C, 513 ovocitos (41,78 por ciento) y la categoría D 351 ovocitos (28,58 por ciento). Figura 5.

El promedio de ovocitos/ovario recuperados por categoría fue: Categoría A 1,44; Categoría B 1,04; Categoría C 2,99 y Categoría D 2,10. Figura 6.

De los cuales se seleccionaron para maduración los ovocitos de categoría A y B; lo que nos dio un total de 364 ovocitos aptos lo que nos dio como resultado un promedio de 2,19 ovocitos/ovario aptos para maduración, comparando con Gómez (2012) que tuvo 2,46 ovocitos/ovario por técnica de aspiración fue menor y para la técnica de slicing 2,08 fue mayor. Hernández-Fernández *et al.*, (2010) obtuvieron 3,24 y 4,37 por técnica de aspiración y slicing, comparando con este autor el resultado del fue mucho menor.



Figura 5: Cantidad de ovocitos por categoría por grupo.

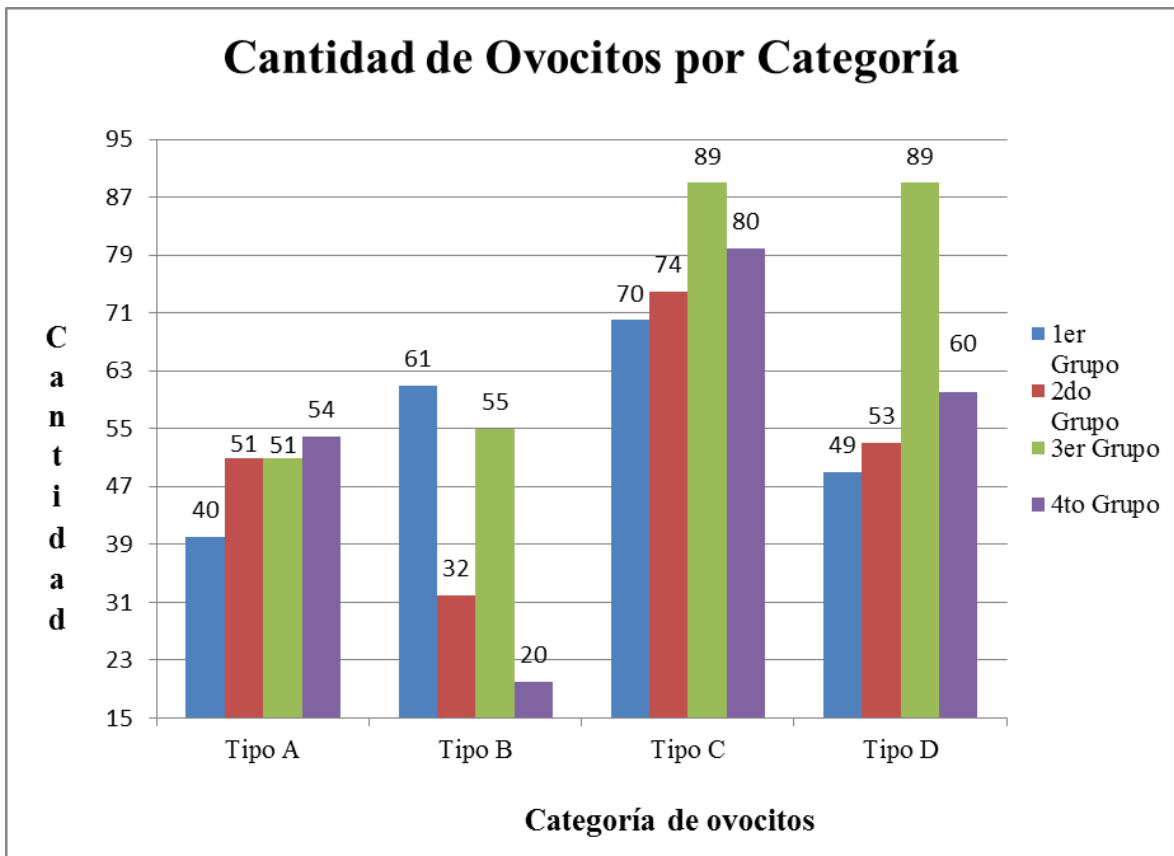
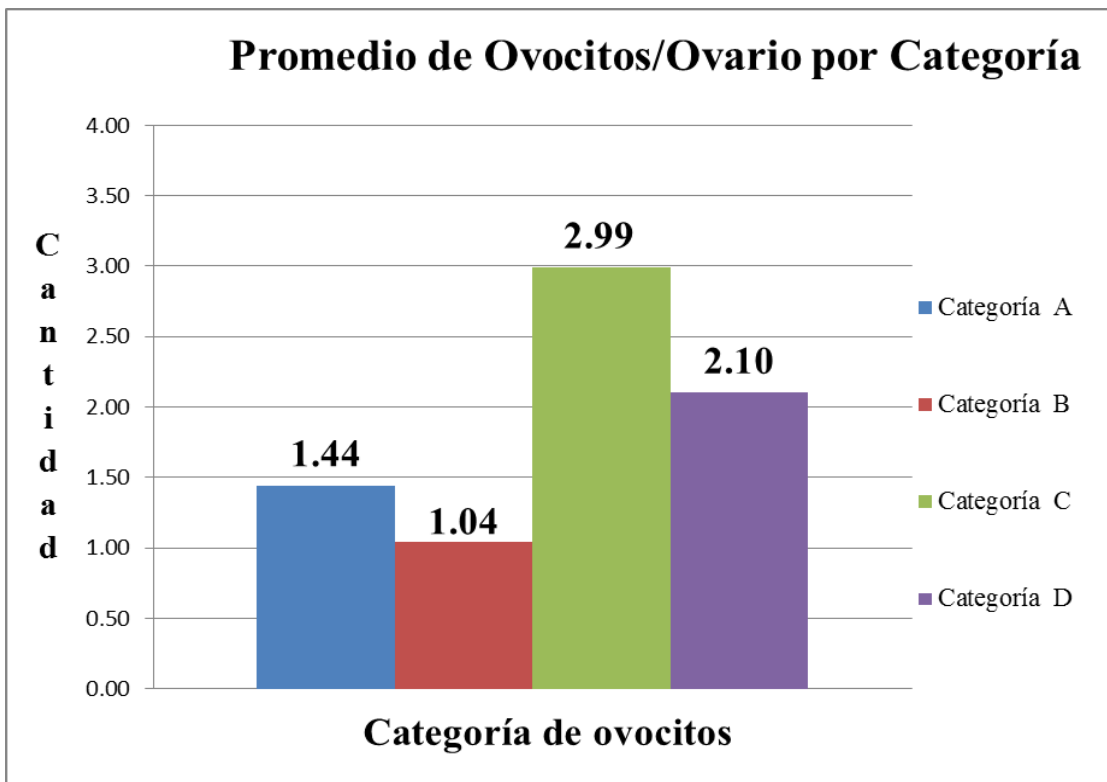


Figura 6: Promedio de ovocitos por categoría por grupo.



De todos estos ovocitos recuperados, se pudo seleccionar como aptos para el cultivo de maduración *in vitro* a 306 ovocitos categoría A y B que dio un 29.64 por ciento, divididos en dos grupos morfológicos descritos en materiales y métodos (A y B). Para el tipo A, se obtuvo un 15.96 por ciento del total de ovocitos recuperados, para el tipo B del 13.68 por ciento.

## 4.2 MADURACIÓN DE OVOCITOS

En la tabla: 5, se exponen los resultados relativos a la maduración *in vitro*. Las cifras mostradas corresponden a los estadios meióticos que alcanzaron los ovocitos después de 24 horas de maduración *in vitro*. La tabla: 6 muestra los resultados obtenidos por los ovocitos tipo A y Tipo B. Los resultados son obtenidos de 19 repeticiones en el tratamiento. Las cifras mostradas en el estadio de metafase I son la suma de las obtenidas en los estadios de metafase, anafase y telofase I.

El presente estudio permitió determinar los criterios de maduración ovocitaria; durante esta etapa los ovocitos alcanzaron el estadio de metafase II, estado que permite que ocurra la fecundación en condiciones *in vivo*, y por lo tanto, el más apropiado para valorar, con la máxima certeza, el éxito de la progresión meiótica durante el sistema *in vitro*.

De los ovocitos no determinado (ND) de acuerdo a la prueba de  $\chi^2$ , la placa 11 es significativa, con un ovocito no determinado (ND) de 6 observados ( $p=0.07$ ). Tabla 1 del anexo.

De los ovocitos en metafase I (MI) de acuerdo a la prueba de  $\chi^2$ , la placa 17 es significativa, con 2 ovocitos en metafase I (MI) de 14 observados ( $p=0.001$ ). Tabla 1 del anexo.

De los ovocitos en metafase II (MII) de acuerdo a la prueba de  $\chi^2$ , las placas 5 y 7 son significativas estadísticamente, con un numero de ovocitos de 15 de 25 en la placa 5, 12 de 20 en la placa 7 ( $p=0.001$ ). Tabla 1 del anexo.

Los datos obtenidos en el presente trabajo de maduración *in vitro* tuvieron un promedio de 57.78 por ciento Figura 7, y la de otros autores desde 45 por ciento hasta 89 por ciento, los autores que utilizaron hormonas (FSH, LH y estradiol 17 $\beta$ ) en sus medios de maduración (Armstrong *et al.*, 1991) y también análogos a otros trabajos en los que se utilizó, además de suplementación sérica y hormonal, cocultivo con células de granulosa (Fukui Y. *et al.*, 1989). Rodríguez B., Marcano L., Villamediana P., 2005 presentaron un porcentaje de maduración (MII) de 49.58 por ciento el cual fue mucho menor a los resultados del presente trabajo. Pero comparando con Feria A. (2013) que obtuvo 72.4 por ciento de maduración *in vitro* obtenido con medio IVC®, Rodríguez B., Marcano L., Villamediana P., (2005) 51.7 por ciento, Báez *et al.*, (2008) 57.5 por ciento y Báez *et al.*, (2010) 68.5 por ciento, quienes utilizaron el medio TCM- 199, fue mucho menor.

Esta cierta similitud entre los efectos producidos por los factores de crecimiento y las hormonas sobre la maduración pudo deberse a que, como señalaron Downs *et al.*, (1985), ciertos mecanismos de actuación celular son análogos, sobre todo los relativos al papel jugado por el AMPc; por ello, parece claro que estos dos tipos de reguladores ováricos, que *in vivo* probablemente ejercen funciones sinérgicas, utilicen parecidos mecanismos de actuación celular, aunque la utilización de los factores de crecimiento (GF) suponga una mayor especificidad de la acción sobre el cúmulo celular (EGF) y sobre el citoplasma (IGF-I) del ovocito que la acción hormonal.

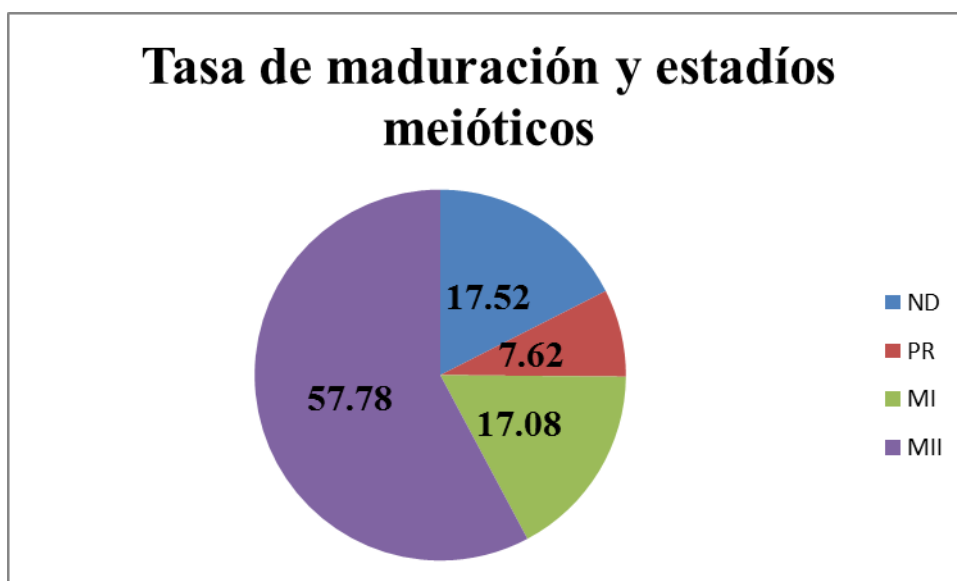
Tabla: 5 Estadíos de maduración *in vitro* de los ovocitos Tipo A y B.

Placa	ND	PR	MI	MII	TOTAL
1	6	2	1	8	17
2	2	1	8	10	21
3	3	2	4	21	30
4	2	4	2	8	16
5	3	1	6	15	25
6	3	0	5	15	23
7	4	1	3	12	20
8	7	2	5	22	36
9	3	1	1	3	8
10	0	1	0	6	7
11	1	0	2	3	6
12	4	0	0	0	4
13	7	0	4	8	19
14	0	1	1	5	7
15	0	1	1	4	6
16	0	0	1	3	4
17	1	1	3	14	19
18	0	0	3	14	17
19	1	4	5	11	21
<b>TOTALES</b>	<b>47</b>	<b>22</b>	<b>55</b>	<b>182</b>	<b>306</b>

Tabla: 6 Porcentaje de estadios de maduración *in vitro* de los ovocitos Tipo A y B

Placa	ND	PR	MI	MII	TOTAL
1	35.29	11.76	5.88	47.06	100.00
2	9.52	4.76	38.10	47.62	100.00
3	10.00	6.67	13.33	70.00	100.00
4	12.50	25.00	12.50	50.00	100.00
5	12.00	4.00	24.00	60.00	100.00
6	13.04	0.00	21.74	65.22	100.00
7	20.00	5.00	15.00	60.00	100.00
8	19.44	5.56	13.89	61.11	100.00
9	37.50	12.50	12.50	37.50	100.00
10	0.00	14.29	0.00	85.71	100.00
11	16.67	0.00	33.33	50.00	100.00
12	100.00	0.00	0.00	0.00	100.00
13	36.84	0.00	21.05	42.11	100.00
14	0.00	14.29	14.29	71.43	100.00
15	0.00	16.67	16.67	66.67	100.00
16	0.00	0.00	25.00	75.00	100.00
17	5.26	5.26	15.79	73.68	100.00
18	0.00	0.00	17.65	82.35	100.00
19	4.76	19.05	23.81	52.38	100.00

Figura 7: Tasa de maduración y estadios meióticos.



## V. CONCLUSIONES

- . La tasa de recuperación de ovocitos fue de 7.6 ovocitos/ovario o lo que es equivalente a un 72.66 por ciento.
- . El porcentaje de ovocitos en la etapa de metafase II obtenido fue de 57.78 por ciento.

## **VI. RECOMENDACIONES**

1. Los criterios de selección de ovarios, folículos y ovocitos empleados son considerados útiles y efectivos, para lograr buenos índices de maduración *in vitro*.
2. Una forma definitiva de evaluar la maduración *in vitro*, debería ser la capacidad de desarrollo de los embriones derivados de esta técnica.

## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

**Armstrong D.T. Zhang X. Khamsi F. 1991.** Hormonal actions during oocyte maturation influence fertilization and early embryonic developmental. Ann N.Y. Acad. Sci.626: 137-158.

**Baker Y. Franchi. 1967.** The Fine structure of cromosomes in bovine primordial oocytes. J. Reprod. Fertil. 513 p.

**Baker, T. 1982.** Oogenesis and ovulation. Reproduction in mammals. Editado por Austin R. Short, Cambrige: Cambridge university press. p 14-45.

**Bavister, B.D. 1987.** Studies on the developmental blocks in culture hanster embryos. The mammalian preinplantation embryo. Regulation on growth and differentiation *in vitro*. Ed. B.D. Bavister. New York: Plenun press, p 219-249.

**Báez, F. 2008.** Estudio estructural del huso meiótico de ovocitos bovinos vitrificados. Revista Científica 18: 253-261.

**Báez, F. 2010.** Evaluación de la capacidad de desarrollo *in vitro* de ovocitos bovinos provenientes de vacas con predominancia fenotípica bos taurus y bos. Revista Científica 20: 240-250.

**Bornslaeger E. A. 1986.** Effects of protein kinase C activators on germinal vesicle breakdown and polar body emission of mouse oocytes. Experimental Cell Research, 165: 507-517.

**Brackett, B. G.. 1982.** Normal development following *In vitro* fertilization in the cow. Biol. Reprod. 27: 147-158.

**Byskov, A. 1982.** Primordial germ cells an regulation of meiosis. En reproduction in mammals, ed. Por C. Austin, R. Short. Cambrige: Cambrige university press. p. 1-16.



- De Loos F., P. Van Maurik, T. Van Beneden Y TH. A.M. Kruip. 1992.** Structural aspects of bovine oocyte maturation *in vitro*. Mol Reprod. Dev. 31 :208 :214.
- Dekel, N. 1989.** Involvement of protein kinases in the introduction of oocyte maturation in rat. Symposium of in mammals 4.
- Downs, S.M. 1985.** Specificity of epidermal growth factor action on maturation of the murine oocyte and the cumulus oophorus *in vitro*. Biol. Reprod 41.
- Ducibella T., Anderson E. 1988.** Quantitative studies of changes in cortical granule number and distribution in the mouse oocyte during meiotic maturation. Devl. Biol. 130: 184-197.
- Edwards, R.G. 1965.** Maturation *in vitro* of mouse, sheep, pig, rhesus monkey and human ovarian oocytes. Nature, 280:349-351.
- Feria, A. 2013.** Medio Alternativo para maduración *in vitro* de ovocitos bovinos. FMVZUV.
- Fernán-Zegarra R. J. 2004.** Histología normal veterinaria. Ed, Fernán Zegarra, Arequipa, p. 472.
- Franchi, L., Mandil V. Y S. Zuckerman. 1962.** The development of the ovary and the process of oogenesis. En: the ovary, editado por S. Zuckerman, p. 1-88.
- Fukui Y., Fukushima M., Ono H. 1982.** Effect of gonadotropin, steroids and culture media on oocyte maturation. Theriogenology 18: 161-175.
- Fukui Y. 1989.** Effects of sera, hormones and granulosa cells added to culture medium for *in vitro* maturation, fertilization, cleavage and development of bovine oocytes. J. Reprod. Fert. 86: 501-506.
- Fukui Y. 1990.** Effect of follicle cells on the acrosome reaction, fertilization, and developmental competence of bovine oocytes matured *in vitro*. Mol. Reprod. Dev. 26: 40-46.

- Gómez. O. E. 2012.** Técnicas del slicing y aspiración folicular en la eficiencia de la recuperación de ovocitos bovinos criollos postmortem en el camal. Revista Spermova 2012; 2(1): 38 – 39
- Gondos B. 1978.** Oogonia and oocytes in mammals. En: the vertebrata ovary, editado por R. Jones, New York plenum press, p. 83-120.
- Gordon I. 1990.** *in vitro* maturation (IVM) and fertilization (IVF) of cattle ova. Embryo transfer newsletter, 8: 6-11.
- Hasler, J.F. 1993.** Applications of *in vitro* fertilization technology to infertile dairy cows. Proceedings 12th Annual Convention American Embryo Transfer Association, October 22-24, Portland, Maine, USA.
- Hensleig H.C. y A.G. Hunter. 1985.** *in vitro* maturation of bovine cumulus enclosed primary oocytes and their subsequent *in vitro* fertilization and cleavage. J. Dairy Sci. 68: 1546-1562.
- Hernández-Fernández A., Nava-Trujillo H., Vilchez V., 2010.** Comparación de dos métodos de recolección de ovocitos bovinos para maduración *in vitro*. Universidad Nacional experimental Sur del lago “Jesús María Semprum. Zulia-Venezuela.
- Herler R A. Lucas-Hahn. A. Niemann. H, 1992.** Effects of insulin-like growth factor-I on *in vitro* production of bovine embryos. Theriogenology 37: 1213-1224.
- Hyttel P. 1988.** Oocyte maturation and fertilization in cattle. Ultrastructural aspects. Tesis doctoral. The royal veterinary and Agriculture University. Copengahen.
- Hyttel P., X.P. Xu, S. Smith Y T, Greve. 1986.** Ultrastructure of *in vitro* oocyte maturation in cattle. J. Reprod. Fert. 78:618-625.
- Illera M.J., J. Arellano, P. Lorenzo, J. Sanchez, G. Silvan Y J.C. Illera. 1992.** Porcine oocyte maturation with EGF (Epidermal growth factor). Lyon, Francia.p.170.

- Kim C. I. Ellington Y Foote R. 1990.** Maturation, fertilization and development of bovine oocytes *in vitro* using TCM 199 and simple defined medium with coculture. Theriogenology 33: 433-440.
- Laurincik J. 1992.** Workshops of the 12<sup>th</sup> International Congress on Animal Reproduction.
- Leibfried M.L., Critser E.S. Parrish J.L, First N.L. 1989.** *in vitro* maturation and fertilization of bovine oocytes. Theriogenology 31: 6174.
- Leibfried M.L.Y N.L. First. 1979.** Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature *in vitro*. J. Anim. Sci.48:76-86.
- Leibfried-Rutledge M.L., Critser W.H., Eyestone D.L., Northey Y N.L. First. 1986.** Developmental potential of bovine oocytes *in vitro* or *in vivo*.Theriogenology 25: 164-165.
- Lenz R.W., G.D. Wall, M.L. Leibfried, R.L. AX Y N.L. First. 1983.** *in vitro* maturation and fertilization of bovine oocytes are temperature dependent processes. Biol. Reprod. 29:173-179.
- Lonergan P, E. Vergos, A. Kinis, H. Sharif, A. Gallagher Y I. Gordon. 1990.** The effect of recovery method on the type of bovine oocyte obtained for *in vitro* maturation. Theriogenology 35: 231.
- Lonergan P., Vergos E., Kinis A., Sharif H., Gordon I. 1991.** The effect of recovery method on the type of bovine oocyte obtained for IVM. Theriogenology 35:231 (Abstract).
- Lorenzo G. P. 1992.** Maduración *in vitro* de oocitos de ganado vacuno.
- Montgomery, D. 1991.** Diseño y análisis de experimentos. Grupo Editorial Iberoamérica. p.112-114.
- Moor R.M. Y A.O. Trounson. 1977.** Hormonal and follicular factors affecting maturation in sheep oocytes *in vitro* and their subsequent development capacity. J. Reprod. Fertil.49: 101-109.

- Motlik J. Y J. Fulka. 1986.** Factors affecting meiotic competence in pig oocytes. *Theriogenology* 25: 87-96.
- Pavlov A., A Lucas-Hann Y H. Niemann. 1992.** Fertilization and developmental competence of bovine oocytes derived from different categories on antral follicles. *Mol. Reprod. Dev.* 31:63-67.
- Rodríguez B. Marcano L.Villamediana P. 2005.** Efecto de la exposición al cloruro de cadmio sobre la maduración *in vitro* de ovocitos bovinos. *Revista Científica (Maracibo)* 15: 443-450.
- Rose T. Y B.D. Bavister. 1992.** Effect of oocyte maturation medium on *in vitro* development of *in vitro* fertilized bovine embryos. *Mol. Reprod. Dev.* 31:72-77.
- Sanbuissho A., S. Coskum. 1992.** Stimulatory action of epidermal growth factor (EGF) on *in vitro* bovine oocyte maturation. *Assisted Reprod. Tec.androl* 1 : 143-153.
- Sato E., A. Iritani Y Y. Nishikawa. 1977.** Factors involving in maturation of pig and cattle follicular oocytes cultured *in vitro*. *Jap. J. Anim. Reprod.* 23 :12-18.
- Schellander . 1990.** *in vitro* fertilization and cleavage of bovine oocytes matured in medium supplemented with estrous cow serum. *Theriogenology* 33: 477-485.
- Sirard M.A. 1985.** *in vitro* fertilization of bovine follicular oocytes obtained by laparoscopy. *Biology Reproductive.* 33:487-494.
- Sirard M.A., K. Coenen Y S. Bilodeau. 1992.** Effect of fresh or cultured follicular fractions on meiotic resumption in bovine oocytes. *Theriogenology* 37:39- 57.
- Sreenan J. 1970.** *in vitro* maturation and attempted fertilization of cattle follicular oocytes. *J. Agric. Sci. Cambrige* 75:393-396.
- Sugie T., G.E. Seidel Y E.S.E. Hafez. 1987.** *Reproduction in farm animals*, editado por E.S.E. Hafez. Philadelphia: Lea y Febirger. p.569-594.
- Thibault C. 1987.** Mammalian oocyte maturation. *Reprod. Nutr. Dev* 27:865-896.

- Tsafri A. Y. C.P. Channing. 1975.** Inhibitory influence of granulosa cells and follicular fluid upon porcine oocyte meiosis *in vitro*. *Endocrinology* 96:922-927.
- Wassarman P.M. 1988.** The mammalian ovum. The physiology of reproduction, editado por E. Knobil y J.D. Neill. New York: Raven press, p.69-102.
- Whitten W.K. 1971.** Nutrient requirements for the culture of preimplantation embryos *in vitro*. En: Schering Symposium on intrinsic and extrinsic factors in early mammalian development advances in the biosciences, editado por G. Raspe. Oxford: Pergamon Press, p.129-141
- Wiemer K.E, A.W. Watson, V. Polanski, A.I. McKenna, G.H. Fick Y G.A Schultz. 1991.** Effects of maturation and co-culture treatments on the developmental capacity of early bovine. *Mol. Reprod. Dev.* 30:330-338.
- Xu K.P., T. Greve, S. Smith Y P. Hyttel. 1986.** Chronological changes of bovine follicular oocyte maturation *in vitro*. *Acta vet. Scand.* 27:505-519.
- Yang N.S., K.H Lu Y L. Gordon. 1990.** *in vitro* fertilization and culture of bovine oocytes from stored ovaries. *Theriogenology* 33:352.
- Yoshida M., K. Ishigaki Y V.G. Pursell. 1992.** Effect of maturation media on male pronucleus formation in pig oocytes matured *in vitro*. *Mol. Reprod. Dev.* 31:68-71.
- Younis A.I. Y B.G. Brackett. 1992.** Thyroid stimulating hormone enhancement of bovine oocyte maturation *in vitro*. *Mol. Reprod. Dev.* 31:144-151.
- Zuckermann S. 1962.** The ovary. Vol I. New York: Academic Press.
- Zuelke, K. A., Brackett, B.G. 1990.** Luteinizing hormone enhanced *in vitro* development of *in vitro* fertilized bovine embryos. *Mol. Rep. Dev.* 31: 72 - 77.
- Zuelke K.A. 1990.** Luteinizing hormone-enhanced *in vitro* maturation in bovine oocytes with and without protein supplementation. *Biol. Reprod.* 43:784-787.

### VIII. Anexo

Tabla: 1 Prueba de Chi<sup>2</sup> para estadios de maduración *in vitro* de los ovocitos Tipo A y B

PLACA	ND	PR	MI	TL	MII	Total
1	6	2	0	1	8	17
	2.61	1.22	1.83	1.22	10.11	
	4.398	0.495	1.833	0.04	0.441	
2	2	1	3	5	10	21
	3.23	1.51	2.26	1.51	12.49	
	0.466	0.172	0.239	8.068	0.496	
3	3	2	4	0	21	30
	4.61	2.16	3.24	2.16	17.84	
	0.561	0.011	0.181	2.157	0.559	
4	2	4	1	1	8	16
	2.46	1.15	1.73	1.15	9.52	
	0.085	7.059	0.305	0.02	0.242	
5	3	1	6	0	15	25
	3.84	1.8	2.7	1.8	14.87	
	0.184	0.354	4.049	1.797	0.001	
6	3	0	2	3	15	23
	3.53	1.65	2.48	1.65	13.68	
	0.08	1.654	0.093	1.096	0.127	
7	4	1	3	0	12	20
	3.07	1.44	2.16	1.44	11.9	
	0.28	0.133	0.33	1.438	0.001	
8	7	2	5	0	22	36
	5.53	2.59	3.88	2.59	21.41	
	0.391	0.134	0.322	2.588	0.016	
9	3	1	0	1	3	8
	1.23	0.58	0.86	0.58	4.76	
	2.553	0.314	0.863	0.314	0.65	
10	0	1	0	0	6	7
	1.08	0.5	0.75	0.5	4.16	
	1.075	0.49	0.755	0.503	0.81	

11	1	0	1	1	3	6
	0.92	0.43	0.65	0.43	3.57	
	0.007	0.431	0.193	0.75	0.091	
12	4	0	0	0	0	4
	0.61	0.29	0.43	0.29	2.38	
	18.657	0.288	0.431	0.288	2.379	
13	7	0	3	1	8	19
	2.92	1.37	2.05	1.37	11.3	
	5.709	1.366	0.441	0.098	0.964	
14	0	1	1	0	5	7
	1.08	0.5	0.75	0.5	4.16	
	1.075	0.49	0.08	0.503	0.168	
15	0	1	0	1	4	6
	0.92	0.43	0.65	0.43	3.57	
	0.922	0.75	0.647	0.75	0.052	
16	0	0	0	1	3	4
	0.61	0.29	0.43	0.29	2.38	
	0.614	0.288	0.431	1.765	0.162	
17	1	1	2	1	14	19
	2.92	1.37	2.05	1.37	11.3	
	1.261	0.098	0.001	0.098	0.645	
18	0	0	2	1	14	17
	2.61	1.22	1.83	1.22	10.11	
	2.611	1.222	0.015	0.04	1.496	
19	1	4	0	5	11	21
	3.23	1.51	2.26	1.51	12.49	
	1.536	4.107	2.265	8.068	0.178	
Total	47	22	33	22	182	306